

1/7/3  
 DIALOG(R) File 350:Derwent WPIX  
 (c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

013823788

WPI Acc No: 2001-308000/200132

Magnetic nanoparticles carrying specific binding agent reactive with intracellular molecule, useful for separating cells, particularly cancerous, and biomolecules

Patent Assignee: BIOMEDICAL APHERESE SYSTEME GMBH (BIOM-N); TRIDELTA BIOMEDICAL GMBH (TRID-N); TRIDELTA BIO MEDICAL GMBH (TRID-N)

Inventor: BUSKE N; CLEMENT J; DIMITRI BERKOV M B K; GANSAU C; GOERNERT P; HOEFFKEN K; KLICKE K; KOBER T; SCHNABELRAUCH M; VOGT S; WAGNER K; BAHR M K; BERKOV D; BAHR M

Number of Countries: 095 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200119405	A2	20010322	WO 2000EP9004	A	20000914	200132 B
DE 10046508	A1	20010405	DE 10046508	A	20000914	200132
AU 200116943	A	20010417	AU 200116943	A	20000914	200140
EP 1216060	A2	20020626	EP 2000979466	A	20000914	200249
			WO 2000EP9004	A	20000914	
BR 200014252	A	20021119	BR 200014252	A	20000914	200305
			WO 2000EP9004	A	20000914	
CN 1379687	A	20021113	CN 2000813707	A	20000914	200317
JP 2003509034	W	20030311	WO 2000EP9004	A	20000914	200319
			JP 2001523036	A	20000914	
US 6767635	B1	20040727	WO 2000EP9004	A	20000914	200449
			US 200288437	A	20020524	

Priority Applications (No Type Date): DE 199044971 A 19990914

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 200119405 A2 G 31 A61K-047/48

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

DE 10046508 A1 A61K-038/17

AU 200116943 A A61K-047/48 Based on patent WO 200119405

EP 1216060 A2 G A61K-047/48 Based on patent WO 200119405

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

BR 200014252 A A61K-047/48 Based on patent WO 200119405

CN 1379687 A A61K-047/48

JP 2003509034 W 27 C12M-001/00 Based on patent WO 200119405

US 6767635 B1 B32B-005/16 Based on patent WO 200119405

Abstract (Basic): WO 200119405 A2

NOVELTY - Magnetic nanoparticles (A) with biochemical activity comprises a magnetic core particle (I) and an attached covering layer (C), and includes a group Z, i.e. nucleic acid, protein and/or peptide (or their derivatives), having at least one structure that binds specifically with a binding domain in an intracellular biomolecule.

DETAILED DESCRIPTION - Magnetic nanoparticle (A) with biochemical activity comprises a magnetic core particle (I) and an attached covering layer (C). (A) comprise a compound of formula M-S-L-Z.

Z=nucleic acid, protein and/or peptide (or their derivatives), having at least one structure that binds specifically with a binding domain in an intracellular biomolecule;

M=magnetic core;

S=biocompatible substrate;

L=linker.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(a) dispersion of (A) in a carrier liquid;

(b) biochemically active compound of formula S-L-Z (II);

(c) methods for preparing (A); and

(d) method for preparing (II).

USE - (A) are used to separate (i) cells, particularly malignant cells, but also healthy (e.g. embryonic) cells having a cell-specific gene expression pattern or (ii) intracellular biomolecules, particularly for molecular diagnosis of altered gene structures, especially precise identification of the breakpoint in the Philadelphia chromosome present in patients with chronic myeloid leukemia, but also solid tumors of breast and colon.

ADVANTAGE - (A) can penetrate cell membranes and bind very specifically to intracellular biomolecular targets, resulting in particle agglomeration and allowing separation of target cells in a magnetic field (contrast known methods of selection based on surface markers). They have high biocompatibility.

pp: 31 DwgNo 0/0

Derwent Class: A96; B04; B05; D16; P73

International Patent Class (Main): A61K-038/17; A61K-047/48; B32B-005/16;

C12M-001/00

International Patent Class (Additional): A61K-009/51; A61K-031/711;

A61K-049/00; C07K-017/14; G01N-033/48; G01N-033/536; G01N-033/553

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-509034

(P2003-509034A)

(43) 公表日 平成15年3月11日 (2003.3.11)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マ-ト (参考)

C 1 2 M 1/00

Z N A

C 1 2 M 1/00

Z N A A 2 G 0 4 5

A 6 1 K 49/00

A 6 1 K 49/00

Z 4 B 0 2 9

G 0 1 N 33/48

G 0 1 N 33/48

S 4 C 0 8 5

33/536

33/536

E 4 H 0 4 5

33/553

33/553

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-523036(P2001-523036)

(86) (22) 出願日 平成12年9月14日 (2000.9.14)

(85) 翻訳文提出日 平成14年3月14日 (2002.3.14)

(86) 国際出願番号 P C T / E P 0 0 / 0 9 0 0 4

(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 1 9 4 0 5

(87) 国際公開日 平成13年3月22日 (2001.3.22)

(31) 優先権主張番号 1 9 9 4 4 9 7 1 . 6

(32) 優先日 平成11年9月14日 (1999.9.14)

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 バイオメディカル アフエレーゼ システ  
ム ゲーエムベーハードイツ連邦共和国 07745 イェナ, ウイ  
ンツェラー シュトラーセ 2アー(72) 発明者 パール, ミカエル, ケイ  
ドイツ連邦共和国 ウエイマー 99425  
アム シースハウス 22(72) 発明者 ベルコフ, ディミトリ  
ドイツ連邦共和国 07747 イェナ, カ  
ール-リープネヒト-シュトラーセ 68

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学活性を有する磁性ナノ粒子、その製造法と使用

## (57) 【要約】

本発明は、磁性ナノ粒子、その製造、およびその使用に関する。本発明の目的は、細胞内生体巨大分子に特異的に結合することができるナノ粒子（これも、細胞の細胞内領域中にある）を調製して、外部磁界の作用により分離を可能にすることである。これは、生化学的活性を有し、かつ磁性核粒子と、この核粒子に固定されたシェル層とからなる磁性ナノ粒子を使用して、行われる。磁性ナノ粒子は、一般式 M-S-L-Z (I) の化合物を含み、SとLおよびLとZの間の結合部位は、共有結合した官能基を有する。Mは、磁性核粒子を表し、Sは、Mに固定された生体適合性基質を表し、Lは、リンカー基を表し、Zは、核酸、ペプチドもしくはタンパク質またはこれらの誘導体からなる基を表し、この基は、細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができる少なくとも1つの構造を有する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 磁性コア粒子とこのコア粒子に固定されたエンベロープ層とからなる生化学的活性を有する磁性ナノ粒子であって、磁性ナノ粒子は、一般式



の化合物を含み、SとLおよびLとZの間の結合部位は、共有結合した官能基を有することを特徴とする上記ナノ粒子

(ここで

Mは、磁性コア粒子を表し；

Sは、Mに固定された生体適合性基質を表し；

Lは、リンカー基を表し；そして

Zは、核酸、ペプチドもしくはタンパク質またはこれらの誘導体からなる基を表し、この基は、細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができる少なくとも1つの構造を有する)。

【請求項2】 コア粒子は、磁鉄鉱、磁赤鉄鉱、一般式 $MeO, Fe_2O_3$  (ここでMeは、コバルト、マンガン、または鉄のような2価金属からなる) のフェライト、またはコバルト、鉄、ニッケル、炭化鉄、または窒化鉄からなることを特徴とする、請求項1に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項3】 コア粒子のサイズは、2～100 nmであることを特徴とする、請求項1または2に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項4】 請求項1～3までのいずれかに記載の磁性ナノ粒子であって

生体適合性基質Sは、ポリーもしくはオリゴ糖またはこれらの誘導体 (例えばデキストラン、カルボキシメチルデキストラン、デンプン、デンプンジアルデヒド、キチン、アルギン酸塩alginate、セルロース、カルボキシメチルセルロース)、タンパク質またはこれらの誘導体 (例えばアルブミン、ペプチド)、合成ポリマー (例えばポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレンイミン、ポリメタクリレート)、2官能性カルボン酸およびこれらの誘導体 (例えばメルカプトコハク酸またはヒドロキシカルボン酸) のような化合物であることを特徴とする、上記磁性ナノ粒子。

【請求項5】 請求項1～4までのいずれかに記載の磁性ナノ粒子であって

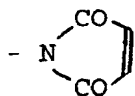
リンカー基Lは、ポリーおよびジカルボン酸、ポリヒドロキシカルボン酸、ジアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、リポタンパク質、糖タンパク質、レクチン、オリゴ糖、多糖、オリゴヌクレオチド、およびこれらのアルキル化誘導体、および1本鎖または2本鎖型で存在する核酸(DNA、RNA、PNA)およびこれらのアルキル化誘導体のような化合物の反応により形成され、この化合物は、少なくとも2つの同一のまたは異なる官能基を含むことを特徴とする、上記磁性ナノ粒子。

【請求項6】 請求項1～5までのいずれかに記載の磁性ナノ粒子であって

官能基は、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOR}$ のような基であり、ここで

Rは、アルキル、アシルまたはアリール残基および

【化1】



である、上記磁性ナノ粒子。

【請求項7】 SとMは、互いに共有結合していることを特徴とする、請求項1～6までのいずれかに記載の磁性ナノ粒子。

【請求項8】 静電結合が、MとSとの間で形成されることを特徴とする、請求項1～7までのいずれかに記載の磁性ナノ粒子。

【請求項9】 請求項1の磁性ナノ粒子と担体流体とを含んでなる分散物。

【請求項10】 担体流体は、極性および／または非極性溶媒を含むことを特徴とする、請求項9に記載の分散物。

【請求項11】 担体流体は、水および／または水と混合可能な溶媒を含むことを特徴とする、請求項9または10に記載の分散物。

【請求項12】 生理学的添加物が含まれることを特徴とする、請求項9～11のいずれかに記載の分散物。

【請求項13】 一般式(11)

S-L-Z (11)

の生化学的活性化合物であって、SとLおよびLとZの間の結合部位は、共有結合した官能基を有し

ここで

Sは、Mに固定された生体適合性基質を表し；

Lは、生体適合性リンカー基を表し；そして

Zは、核酸、ペプチドおよび／またはタンパク質またはこれらの誘導体からなる基を表し、この基は、細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができる少なくとも1つの構造を有する、上記化合物。

【請求項14】 請求項13に記載の生化学的活性化合物であって、

生体適合性基質Sは、ポリーもしくはオリゴ糖またはこれらの誘導体（例えばデキストラン、カルボキシメチルデキストラン、デンプン、デンプンジアルデヒド、キチン、アルギン酸塩、セルロース、カルボキシメチルセルロース）、タンパク質またはこれらの誘導体（例えばアルブミン、ペプチド）、合成ポリマー（例えばポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレンイミン、ポリメタクリレート）、2官能性カルボン酸およびこれらの誘導体（例えばメルカプトコハク酸またはヒドロキシカルボン酸）のような化合物であることを特徴とする、上記化合物。

【請求項15】 請求項13または14に記載の生化学的活性化合物であって、

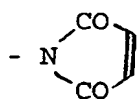
リンカー基Lは、ジカルボン酸、ジアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、リボタンパク質、糖タンパク質、レクチン、オリゴ糖、多糖、オリゴヌクレオチド、およびこれらのアルキル化誘導体、および1本鎖または2本鎖型で存在する核酸（DNA、RNA、PNA）およびこれらのアルキル化誘導体のような化合物の反応により形成され、この化合物は、少なくとも2つの同一のまたは異なる官能基を含むことを特徴とする、上記化合物。

【請求項16】 請求項13～15までのいずれかに記載の生化学的活性化化合物であって、

官能基は、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOR}$ であり、ここで

Rは、アルキル、アシルまたはアリール残基および

【化2】



である、上記化合物。

【請求項17】 以下の反応工程を特徴とする、請求項1に記載の磁性ナノ粒子の製造方法：

- a. それ自体公知の方法で磁性コア粒子を作成し；
- b. 磁性コア粒子を化合物S-L-Z(II)と反応させて化合物M-S-L-Z(I)を生成する。

【請求項18】 以下の反応工程を特徴とする、請求項1に記載の一般式(I)の化合物の製造方法：

- a. それ自体公知の方法で磁性コア粒子を作成し；
- b. 磁性コア粒子を生体適合性基質Sと反応させ；そして
- c. 生成した化合物M-Sを化合物L-Zと反応させる；

ここで、L-Zを作成するために、ポリーおよびジカルボン酸、ポリヒドロキシカルボン酸、ジアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、リポタンパク質、糖タンパク質、レクチン、オリゴ糖、多糖、オリゴヌクレオチド、およびこれらのアルキル化誘導体、および1本鎖または2本鎖型で存在する核酸(DNA、RNA、PNA)およびこれらのアルキル化誘導体のような化合物(この化合物は、少なくとも2つの同一のまたは異なる官能基を有する)を、少なくとも1つの官能基を有し、かつ細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができ、少なくとも1つの構造を含む、核酸、ペプチドおよび/またはタンパク質またはこれらの誘導体と反応させる。

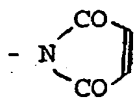
【請求項19】 以下の反応工程を特徴とする、請求項1に記載の一般式(1)の化合物の製造方法：

- a. それ自体公知の方法で磁性コア粒子を作成し；
- b. 磁性コア粒子を生体適合性基質Sと反応させ；そして
- c. 生成した化合物M-Sを、ポリーおよびジカルボン酸、ポリヒドロキシカルボン酸、ジアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、リポタンパク質、糖タンパク質、レクチン、オリゴ糖、多糖、オリゴヌクレオチド、およびこれらのアルキル化誘導体、および1本鎖または2本鎖型で存在する核酸（DNA、RNA、PNA）およびこれらのアルキル化誘導体のような化合物（この化合物は、少なくとも2つの同一のまたは異なる官能基を有する）と反応させ；そして
- d. 生成した化合物M-S-Lを、少なくとも1つの官能基を有し、かつ細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができる少なくとも1つの構造を含む、核酸、ペプチドおよび／またはタンパク質またはこれらの誘導体と反応させる。

【請求項20】 請求項17～19の方法であって、  
化合物S、L、およびZは、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOR}$ のような官能基を介して結合し、ここで

Rは、アルキル、アシルまたはアリール残基および

【化3】



である、上記方法。

【請求項21】 以下の反応工程を特徴とする、請求項13に記載の生化学的活性化合物の製造方法：

- a. 化合物L-Zを作成し；
- b. L-Zを生体適合性基質Sと反応させる；

ここで、L-Zを作成するために、ポリーおよびジカルボン酸、ポリヒドロキシ

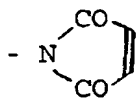
カルボン酸、ジアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、リボタンパク質、糖タンパク質、レクチン、オリゴ糖、多糖、オリゴヌクレオチド、およびこれらのアルキル化誘導体、および1本鎖または2本鎖型で存在する核酸(DNA、RNA、PNA)およびこれらのアルキル化誘導体のような化合物(この化合物は、少なくとも2つの同一のまたは異なる官能基を有する)を、少なくとも1つの官能基を有し、かつ細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができ、少なくとも1つの構造を含む、核酸、ペプチドおよび/またはタンパク質またはこれらの誘導体と反応させる。

【請求項22】 請求項21に記載の方法であって、

化合物S、L、およびZは、 $-CHO$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、 $-OH$ 、 $-COOR$ のような官能基を介して結合し、ここで

Rは、アルキル、アシルまたはアリール残基および

【化4】



である、上記方法。

【請求項23】 細胞の分離における、請求項1に記載の磁性ナノ粒子の使用。

【請求項24】 悪性細胞の分離における、請求項1に記載の磁性ナノ粒子の使用。

【請求項25】 細胞内生体巨大分子の分離における、請求項1に記載の磁性ナノ粒子の使用。



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、請求項1、9、13、17、18、19、21、および23～25に記載の、磁気ナノ粒子、その製造法、およびその使用に関する。

## 【0002】

死亡の最も大きな原因は癌である。特に、肺癌、乳癌、および前立腺癌で亡くなる人が増加している。従って、現在医学の主要な目的は、癌の制御である。

## 【0003】

患部臓器の外科的除去以外に、転移性腫瘍を制御するための従来の治療法には、その非特異的作用、すなわち体中の感受性のある領域への作用の結果として健康な細胞にも傷害を与えるため公知の副作用パターンを有する化学療法がある。

## 【0004】

特に、新しいアプローチの治療は、一方ではメッセンジャー物質またはサイトカインにより内因性の抵抗性が活性化され、他方では、タンパク質分子および／またはモノクローナル抗体が腫瘍細胞を破壊するように、免疫反応を利用する。

## 【0005】

腫瘍細胞分離の分野の新しい進展ではすでに、磁性コアを含む粒子（この粒子は、生物活性エンベロープ物質で修飾されている）を使用している。磁性微小球に結合したドキソルビシンその他の細胞増殖抑制物質のような物質を使用するいわゆる「薬剤ターゲティング」が開発中である。

## 【0006】

同様によく知られている「マイクロビーズ」および「ダイナビーズ(dynabeads)」は、すでに診断法で使用されており、磁性微小球が生物学的相互作用により、悪性細胞の細胞膜に吸着され、次に磁性分離に付される。しかし、一般に細胞膜の表面構造は非特異的であり、従って分離率は80%未満である。その結果、多くの癌細胞が分離を受けず、転移する能力を維持するというリスクがある。

## 【0007】

診断目的の分離は、必ず体外経路で行われ、すなわち分離すべき細胞を含む液体が、人体の外の適当な容器中で処理される。分離後、精製された液体は、再度

人体に供給することができる。

【 0 0 0 8 】

悪性細胞の不完全な分離のために、しばらく後にこの操作を繰り返す必要があると予測されるに違いない。この操作は実際、病人に大きなストレスを与えるため、繰り返しの処置は限定される。

【 0 0 0 9 】

DE4116093A1は、磁性粒子の表面の制御された修飾により磁性担体を得る方法を記載している。この方法では、磁性流体を形成することもできる磁性粒子であり、かつヘテロ多価陰イオンおよび飽和または不飽和界面活性剤を担持することを特徴とする磁性粒子が開示される。そのような表面修飾は、生物活性分子（例えば、特に抗体）が粒子の表面に結合できるようにすることを目的とする。生物活性分子は、チオブリッジを介してポリチオールに結合している。特にジカルボン酸やヒドロキシカルボン酸ならびにジメルカプトコハク酸が、リンカー物質として使用される。鉄キレート化基により、これらの化合物は、磁性粒子に結合することができる。

【 0 0 1 0 】

生体適合性が不十分なため、その表面上に生物活性分子を含むこれらの磁性粒子は、細胞内コンパートメントに透過してその中の生物巨大分子に結合させる目的には適していないことが判った。

【 0 0 1 1 】

DE19624426A1は、診断活性または治療活性のある物質を輸送するのに使用される磁性流体を記載している。この磁性コア粒子は、共有結合またはイオン交換が可能な反応性基を有するポリマーで包まれる。このエンベロープ（これは、実際生体適合性であり、特にデキストランからなっておりよい）上では特に、新しいかまたは追加の官能基（例えば、無水コハク酸またはクロロ酢酸）が、結合または活性化され、次にここに診断活性または治療活性のある物質を、異極性結合または共有結合を介して固定することができる。上記のように磁性粒子に結合した薬剤は、静脈内経路で投与可能であり、標的領域（例えば、腫瘍または炎症性組織領域）内の高傾斜磁場を用いて固定されて、その中で診断または治療作用を示す。

磁界中でのそのような輸送を可能にするために、磁性粒子の高い静脈内利用可能性が必要であり、その粒子サイズは、200～500 nmと規定される。この場合も、粒子は、粒子のサイズのために、細胞内コンパートメント中に透過することができない。さらにこれらの粒子では、細胞内生体巨大分子への特異的結合は不可能である。

【 0 0 1 2 】

本発明の目的は、細胞の細胞内領域中でも細胞内生体巨大分子への結合を特異的に形成することができるナノ粒子を提供して、外部磁界への暴露により分離を可能にすることである。

【 0 0 1 3 】

本発明において、該目的は、請求項1、9、13、17、18、19、21、および23～25の特徴により達成される。

【 0 0 1 4 】

本発明の磁性ナノ粒子は、細胞膜を透過して細胞内コンパートメント中に入り、その中の細胞内生体巨大分子と相互作用することができるので有利である。

【 0 0 1 5 】

磁性ナノ粒子は、フェリ磁性物質または強磁性物質からなり、かつ、生物活性および／または治療的に有効なエンベロップ層を有する。一方では、これらは、細胞の細胞膜を透過することができ、他方では、高特異性で、悪性細胞の細胞内領域中に存在する標的に結合することができる。

【 0 0 1 6 】

一般に、本発明のナノ粒子のサイズは、2～100 nmである。ナノ粒子は、細胞膜を透過し、その改良された物理的適合性について、顕著な性質を有する。その小さな容量のために比較的小さな磁気モーメントを有するが、細胞内標的生体巨大分子への結合により引き起こされる細胞内粒子凝集により、濃度が上昇し、除去すべき悪性細胞の磁気モーメントが上昇し、こうして磁性分離を促進する。

【 0 0 1 7 】

本発明のナノ粒子の典型的なコア物質は、一般的組成が $\text{MeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ （ここで、Meは、Co、MnまたはFeのような2価金属である）のフェライトである。他の適切

な物質は、 $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、純粋な金属Co、Fe、Ni、および金属化合物（例えば、炭化物および窒化物）である。

【0018】

コバルトと鉄の磁気モーメントは、フェライトのそれより最大4倍高く、従って同じ粒子サイズと同じ磁界では、これらの物質はより効果的に除去される。しかし、これらの物質の生体適合性はより低いことを考慮しなければならない。これは、こうして例えば悪性細胞に追加の傷害が与えられる時は、利点となる。一方、健康な細胞中のこれらの物質の暴露時間および濃度は、限定されなければならない。

【0019】

生化学的、医学的および物理的性質の相互作用は、調整した磁性コア物質とエンベロップ層を製造することを必要とする。

【0020】

本発明において、請求項1の磁性ナノ粒子は、細胞膜の透過と、磁性ナノ粒子と細胞内標的生体巨大分子との相互作用とを可能にする。このために、凝集したナノ粒子は、細胞膜を透過できないため、体液中の磁性ナノ粒子の均一な分散が必要である。特にこれは、十分な厚さのエンベロップ層（これは、少なくともコア半径の範囲中でなければならない）と、エンベロップ層成分の良好な生体適合性を必要とする。エンベロップ物質中の電荷担体（すなわち、上昇したゼータ電位）は、体液中の分散性に追加の有効な作用を有し得る。

【0021】

磁性ナノ粒子の特に有効な投与型は、請求項9の分散物である。

【0022】

本発明の磁性ナノ粒子の均一な分布は、ナノ粒子分散物の低濃度を調整することにより促進される。しかしナノ粒子が、細胞の細胞内領域中の標的生体巨大分子上への特異的吸着により濃縮される時、細胞の内部ではより高濃度が生成する。そのような粒子凝集は、細胞の内部では有効である。磁性ナノ粒子のより高濃度の結果として、分離すべき細胞中の磁気モーメントが増加する。

【0023】

磁性コア粒子は、核形成／結晶成長過程を介して水相または有機相中で形成される。化学的沈殿法を使用する水相中での調製は、いくつかの利点を有する。第1工程で非修飾磁性粒子が形成され、これらの粒子は、pHを調整することにより陽性と陰性の両方の符号を有することができる。この時にのみ、エンベロープ分子が、第2の工程で吸着される。吸着の有効性は、磁性コア粒子の表面上の電荷の符号に依存する。一般的に、陰性に荷電した分子部分を有するエンベロープ分子は、好ましくは電荷の陽性符号を有するコア表面に吸着する。これらのほとんどの場合に、イオン性化学反応（例えば、カルボキシル化合物とアミノ化合物を含む）が行われる。そのような反応は、一方では、吸着されたエンベロープ分子がコア表面を完全に覆い、他方では、その上に強く固定される点で有利である。

【 0 0 2 4 】

しばしば、生体適合性基質Sの配位結合は、多糖で知られているように、堅い固定には不十分である。

【 0 0 2 5 】

強磁性金属コア粒子の調製は、主に有機相中の対応する金属カルボニルの熱分解を使用して行われる。このために、有機相に可溶性の界面活性剤またはポリマーを、安定化のために加える。第1の反応工程で、有機相中に均一に分散したコア粒子を形成する。第2の反応工程では、コア粒子を、水性担体流体中に移送する。エンベロープ層が修飾アミノ酸を含むなら、コア粒子の移送は、アルカリ性水性担体流体を加えて有機溶媒を充分除去した後に行われる。エンベロープ層を、磁性コア粒子の分散を引き起こすアミノ酸の水溶性の塩に変換する。次にさらに反応させて、磁性ナノ粒子を生成することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明において磁性ナノ粒子は、一般式M-S-L-Z (I)の化合物を含み、SとLおよびLとZの間の結合部位は、共有結合した官能基を有し、ここで

Mは、磁性コア粒子を表し；

Sは、Mに固定された生体適合性基質を表し；

Lは、リンカー基を表し；そして

Zは、核酸、ペプチドもしくはタンパク質またはこれらの誘導体からなる基を

表し、この基は、細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができる少なくとも1つの構造を有する。

【 0 0 2 7 】

磁性コア粒子は、磁鉄鉱、磁赤鉄鉱、一般式 $MeO \cdot Fe_2O_3$ （ここでMeは、コバルト、マンガン、鉄のような2価金属からなる）のフェライト、またはコバルト、鉄、ニッケル、炭化鉄、または窒化鉄からなる。本発明のさらなる展開において、コア粒子のサイズは、2～100 nmである。

【 0 0 2 8 】

本発明のある実施形態において基質Sは、ポリーもしくはオリゴ糖またはこれらの誘導体（例えばデキストラン、カルボキシメチルデキストラン、デンプン、デンプンジアアルデヒド、キチン、アルギン酸塩、セルロース、カルボキシメチルセルロース）、タンパク質またはこれらの誘導体（例えばアルブミン、ペプチド）、合成ポリマー（例えばポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレンイミン、ポリメタクリレート）、2官能性カルボン酸およびこれらの誘導体（例えばメルカプトコハク酸またはヒドロキシカルボン酸）のような化合物により形成される。

【 0 0 2 9 】

本発明のある実施形態において、リンカー基Lは、ポリーおよびジカルボン酸、ポリヒドロキシカルボン酸、ジアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、リポタンパク質、糖タンパク質、レクチン、オリゴ糖、多糖、オリゴヌクレオチド、およびこれらのアルキル化誘導体、および1本鎖または2本鎖型で存在する核酸（DNA、RNA、PNA）およびこれらのアルキル化誘導体のような化合物の反応により形成され、この化合物は、少なくとも2つの同一のまたは異なる官能基を含む。

【 0 0 3 0 】

本発明の別の変更形態において、官能基は、本発明において基質S、リンカー基L、および基Zの結合基として使用することができる例として提供される。化合物（1）は、共有結合に特徴付けられることが必須である。

【 0 0 3 1 】

一般式S-L-Z (II) の生化学的活性化合物は、本発明の磁性ナノ粒子を生成するのに特に適している。

【 0 0 3 2 】

磁性ナノ粒子の生成は、段階的に行われる。磁性コア粒子は、それ自体公知の方法で作成され、好適な変法では、直接生化学的活性化合物 (II) と反応させられる。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の実施形態において磁性コア粒子は、以下の方法により製造される

- a. それ自体公知の方法で磁性コア粒子を作成し；
- b. 磁性コア粒子を生体適合性基質Sと反応させ；そして
- c. 生成した化合物M-Sを化合物L-Zと反応させる；

ここで、L-Zを作成するために、ポリーおよびジカルボン酸、ポリヒドロキシカルボン酸、ジアミン、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、リボタンパク質、糖タンパク質、レクチン、オリゴ糖、多糖、オリゴヌクレオチド、およびこれらのアルキル化誘導体、および1本鎖または2本鎖型で存在する核酸 (DNA、RNA、PNA) およびこれらのアルキル化誘導体のような化合物 (この化合物は、少なくとも2つの同一のまたは異なる官能基を有する) を、少なくとも1つの官能基を有し、かつ細胞内生体巨大分子の結合ドメインに特異的に結合することができる少なくとも1つの構造を含む、核酸、ペプチドおよび／またはタンパク質またはこれらの誘導体と反応させる。

【 0 0 3 4 】

生化学的活性化合物 (II) を製造方法は、化合物L-Zが最初に作成され、次にL-Zと基質Sとを反応させるものである。

【 0 0 3 5 】

本発明のナノ粒子は、細胞の分離、悪性細胞の分離、および細胞内生体巨大分子の分離に使用することができる。特に、分子マーカーとしての染色体の融合領域は、細胞内生体巨大分子との相互作用のための攻撃の点として作用する。例えばこれらは、特定の疾患に典型的な分子マーカーでもよい。さらにこれらの融合

領域は、融合メッセンジャーリボ核酸（融合mRNA）および融合タンパク質を産生する融合遺伝子となる。例として慢性骨髄性白血病（CML）がある。CMLでは、染色体転位 t(9;22)(q34;q11) が起き、いわゆるフィラデルフィア染色体となり、これが BCR/ABL 遺伝子産物に至る。すなわちそのような染色体異常を有する細胞では、他の体細胞中には存在しない遺伝子が存在する。この遺伝子は、転写されてメッセンジャーリボ核酸（mRNA）となり、BCR/ABL タンパク質が合成される。BCR/ABL mRNA および BCR/ABL タンパク質は、腫瘍細胞にのみ存在する。BCR/ABL mRNA は、磁性ナノ粒子の結合ドメインとして可能である。本発明の磁性ナノ粒子の Z 基は、核酸／核酸相互作用を介して mRNA 上の相補配列と相互作用するものであり、該配列は BCR/ABL 融合部位を含むことが必要である。融合部位の周りの個々の特異的配列は、実験室法を使用してあらかじめ決定される。この相互作用は、腫瘍細胞の細胞質中で起きる。Z 基を介して磁性ナノ粒子が、BCR/ABL mRNA 上の相補配列にいったん結合すると、腫瘍細胞は標識される。

【 0 0 3 6 】

癌の他の例を以下に示す：

【 表 1 】



## 血液学的疾患

## 染色体転位 (融合遺伝子産物)

急性リンパ球性白血病 (ALL)	t(9;22) (q34;q11) (BCR/ABL)
	t(1;19) (q23;p13) (E2A/PBX)
	t(8;14) (q24;q32)
	t(2;8) (p11;q24)
	t(8;22) (q24;q11) (MYC, IGH, IGK, IGL)
	t(4;11) (q21;q23) (MLL/AF2)
急性骨髄[性]白血病 (AML)	t(1;14) (p32;q11) del(1p32) (TAL1, TCRA)
	t(8;21) (q22;q22) (AML/ETO)
	t(15;17) (q21;q11) (PML/RARA)
	inv16(p13;q22) t(16;16) (p13;q22) (MYH11/CBFb)
非ホジキンリンパ腫	t(6;9) (p23;q34) (DEK/CAN)
	(14;18) (q32;q21) (BCL2/IGH)
	t(8;14) (q24;q32)
	t(2;8) (p11;q24)
ユーイング肉腫	t(8;22) (q24;q11) (MYC, IGH, IGK, IGL)
	t(11;14) (q13;q32) (BCL1/IGH)
	t(3;14) (q27;q32) (BCL6/IGH)
	t(11;22) (q24;q12) (FLI1/EWS)

これらの疾患（これは、治療が可能な疾患の単なる例である）について、上記の方法が同様に使用される。各疾患について、1つの典型的な塩基配列があり、これは、以下の染色体部位により明確に説明される。これらの疾患でも、磁性ナノ粒子のZ基は、核酸／核酸相互作用を介してmRNA上の相補配列（結合ドメイン）と相互作用する。任意の可能な疾患についてすべての正確な塩基配列の数は無限であり、CMLだけでも、今日までに10を超える切断領域が開示されており、新しいものも絶えず開示されている。

## 【 0 0 3 7 】

本発明は、種々の利点を有する。まず本発明の磁性ナノ粒子は、対応する細胞培養物の研究において高い生体適合性を有することがわかった。これは、安全な応用を可能にし、また本発明の使用の範囲内で、粒子の純粋に体外の応用が可能である。フローサイトメトリー (FACS) および磁性分離 (MACS) を使用する既存の分離法に対して、本発明の磁性ナノ粒子は、決定的に重要な利点を提供する。これらを使用することにより、細胞の内部（いわゆる細胞質）に到達することができ、生体巨大分子に対応する構造体（例えば、核酸の結合ドメイン）と特異的

に結合させることができる。同様に適当な翻訳により生成されるタンパク質が、一般式 ( I ) の Z 基への特異的結合のための標的生体巨大分子として包含される。現在の知識では、これらの悪性疾患のすべては、細胞中の異常なゲノムに基づく。多くの疾患において、この分子基礎は既に規定されている。既存の遺伝子を融合していわゆる融合遺伝子を生成することは、基本的な疾患と各患者について特異的な塩基配列の、個々の特異的な変化を引き起こす。本発明においておよびこの方法の範囲内で、( I ) 中の Z 基の特異的な結合相手としての改変された遺伝子構造 ( 結合ドメイン ) が、分子的診断薬を使用してまず規定される。その後、結合ドメインの特異的結合相手としての Z 基が合成され、次に臨床的に使用される。さらに、健康な細胞も、結合ドメインとして重要な充分規定された塩基配列を有することに注意されたい。胚細胞は一例であり、この細胞は健康な生物中に存在し、細胞型特異的遺伝子発現の原型であるため、成体細胞とは異なる塩基配列を有する。これらの細胞ならびに悪性細胞は、Z 基の細胞内核酸との特異的結合による細胞内生体巨大分子の磁性分離の標的対象として使用することができる。従って、悪性細胞の分離は、多くのもののほんの一例であることは明らかである。血液からの除去以外に、髄液、リンパ、尿、唾液、精子、ならびに分離した組織への使用も可能である。

#### 【 0 0 3 8 】

磁性ナノ粒子の本発明の使用を、慢性骨髄性白血病の例を使用して、再度詳細に例示する。

#### 【 0 0 3 9 】

昔から慢性骨髄性白血病は、第 9 染色体と第 22 染色体の間の特異的な転座に基づくことが知られており、一般的にフィラデルフィア染色体と呼ばれる。しかし最近の分子的解析は、1 つの特定の疾患でさえ、融合遺伝子とは異なる複数の可能な切断部位 ( すなわち、異なる融合遺伝子 ) が存在し、各患者でこれを規定しなければならないことを示している。従って慢性骨髄性白血病のすべての患者について普遍的な治療法は提供できず、むしろ、前述のように切断部位 ( 結合ドメイン ) の正確な位置をまず規定する必要がある。有利なことに適当な性状解析後に、切断部位が、本発明の磁性ナノ粒子を用いて特異的に解析される。これで悪

性クローンの細胞が標識され、次に所望の方法で分離される。原理的にこの方法は、他のすべての疾患について可能である。固形腫瘍（例えば、乳癌または結腸癌）もまた、その分子的基礎についての理解が増加している。乳癌や腸癌の遺伝型は、まだ最も高率に起きる散発型からは区別することができる。再度、特定の遺伝子パターンの発現を使用して、悪性細胞が標識され、所望の型で単離される。原理的に、流体および組織の両方からの抽出が可能である。この点で、そのような特異的方法を可能にする磁性ナノ粒子は他に無く、これは、磁性粒子の生体巨大分子への結合を使用する完全に新しい方法であることに注目されたい。

#### 【 0 0 4 0 】

以下の実施例を参照して本発明をより詳細に例示する。

#### 【 0 0 4 1 】

実施例：

実施例 1

0.5モルの $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ と1モルの $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を、100mlの水に完全に溶解し、濃水酸化アンモニウムをpHが9になるまで攪拌しながら加える。分散液中の黒い粒子を磁性手段により分離し、上清をデカントする。次に分散液を、半濃HClを使用してpH 1～4にし、こうして粒子の電荷を交換する。この操作を、粒子が再分散し始めるまで繰り返す。次にこれを遠心分離（5,000～10,000 g）し、粒子の少ない上清をデカントする。残渣をHCl（3～10N）に取り、pH値4～5で伝導度が20～500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ に達するまで、完全な操作を繰り返すか、または同じ値が得られるまで残渣をHCl（3～10N）に対して透析する。

#### 【 0 0 4 2 】

生成した安定な磁鉄鉱／磁赤鉄鉱ゾルの飽和分極は、最大6 mTである。

#### 【 0 0 4 3 】

実施例 2

0.5モルの $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ と1モルの $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を、100mlの水に完全に溶解し、濃水酸化アンモニウムをpHが9になるまで攪拌しながら加える。分散液中の黒い粒子を磁性手段により分離し、上清をデカントする。次にここに、数mlの過酸化水素（30%）を加えて、粒子を酸化して磁赤鉄鉱を生成させる。次に、実施例 1

に記載したように半濃HClを加えて粒子を処理する。

【 0 0 4 4 】

生成した安定な磁赤鉄鉱ゾルの飽和分極は、最大6 mTである。

【 0 0 4 5 】

#### 実施例 3

実施例 1 と 2 に記載の100mlの磁鉄鉱および／または磁赤鉄鉱ゾルに、20mlの水に溶解した6 gのCM-デキストラン (DS 0.4~2) を加えて、混合物を攪拌しながら40~80℃、好ましくは50~60℃で30分加熱する。次に、CM-デキストランで被覆された磁鉄鉱／磁赤鉄鉱粒子からなる生成した安定なゾルを、水に対して透析して精製する。

【 0 0 4 6 】

#### 実施例 4

25mlの水中の0.6 gのCM-デキストラン (DS 0.4~2) の溶液に、2.04 gの $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を溶解した13.1mlの1Mの塩化Fe(III)溶液を、攪拌しながら70℃でゆっくり滴下して加える。次に希NaOH (2N) を加えて反応混合物をpH 9~10にして、これを次に、希HCl (2N) で中和し、70℃で2時間攪拌し、希NaOHまたはHClを加えて溶液のpH値を約6.5~7.5に維持する。反応混合物を冷却し、次に遠心分離して不溶性物質を除去し、得られた磁性流体を水に対して透析して精製する。

【 0 0 4 7 】

CM-デキストランで被覆されたナノ粒子の飽和分極は、最大6 mTである。

【 0 0 4 8 】

#### 実施例 5

実施例 1 と 2 に記載の100mlの磁鉄鉱および／または磁赤鉄鉱ゾルに、20mlの水に溶解した2 gのジメルカプトコハク酸を加え、混合物を攪拌しながら70℃で30分加熱する。ジメルカプトコハク酸で被覆された磁鉄鉱／磁赤鉄鉱粒子からなる生成した安定なゾルを、水に対して透析して精製する。飽和分極は、1~8 mT、好ましくは3~6 mTである。

【 0 0 4 9 】

#### 実施例 6

実施例 1 と 2 に記載の 100ml の磁鉄鉱および／または磁赤鉄鉱ゾルに、100ml の水に溶解した 6 g のウシアルブミンを加え、混合物を攪拌しながら 70℃ で 30 分加熱する。アルブミンで被覆された磁鉄鉱／磁赤鉄鉱粒子からなる生成した安定なゾルを、水に対して透析して精製する。

## 【 0 0 5 0 】

## 実施例 7

実施例 1 または 2 で作成した 100ml の分散液を、7 g の N-オレオイルサルコシン (BASF からの Korantin SH) を含有するアルカリ性溶液中で混合し、50～80℃、好ましくは 65℃ で 30 分攪拌する。混合すると粒子が凝集するが、pH 値をアルカリ性範囲 (好ましくは 8～9) に維持すると再安定化する。酸性範囲では粒子が沈殿するが、アルカリ性範囲で再分散される。

## 【 0 0 5 1 】

## 実施例 8

10ml の水に溶解した 1 mg のコハク酸に、等モル量の水溶性カルボジイミド (N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩) を攪拌しながら加え、これを 5～10℃ で 30 分攪拌する。次に 50  $\mu$  l のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 10  $\mu$  g のアミノ官能化オリゴヌクレオチド (5'-H<sub>2</sub>N-ACTGGCCGCTGAAGGGCTTCTGCGTCTCCA-OH-3') を加え、混合物を 5～10℃ で 24 時間維持する。副産物と未反応出発物質を除去するために、これを水に対して透析し、反応生成物を凍結乾燥する。

## 【 0 0 5 2 】

## 実施例 9

実施例 8 に従って官能化し 100  $\mu$  l のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 10  $\mu$  g のオリゴヌクレオチドに、20  $\mu$  g の水溶性カルボジイミド (N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩) を攪拌しながら加え、これを 5～10℃ で 30 分維持する。次にこの溶液を、20ml のリン酸緩衝液に溶解した 200mg のアルブミンに加え、混合物を 5～10℃ で 24 時間維持する。副産物と未反応出発物質を除去するために、これを水に対して透析し、得られた反応生成物を凍結乾燥する。

## 【 0 0 5 3 】

## 実施例10

実施例1と2に記載の1mlの磁鉄鉱および／または磁赤鉄鉱ゾルを、水で1:10の比で希釈し、希NaOHを加えてpH7に調整する。次に、実施例9に従って官能化し10mlのリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した60mgのアルブミンを加え、これを40℃で約30分攪拌しながら加熱する。こうして得られた磁性流体を遠心分離し、水に対して透析して溶液を精製する。

## 【 0 0 5 4 】

## 実施例11

実施例8に従って官能化し100 $\mu$ lのリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した10 $\mu$ gのオリゴヌクレオチドに、20 $\mu$ gの水溶性カルボジイミド(N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)を攪拌しながら加え、これを5~10℃で30分維持する。次にこの溶液を、実施例6に従って調製し水で1:10の比で希釈した10mlの磁性流体に加え、5~10℃で24時間維持し、次に水に対して透析して精製する。

## 【 0 0 5 5 】

## 実施例12

実施例3または4に従って調製した1mlの磁性流体を、水で1:10の比で希釈し、20mgの水溶性カルボジイミド(N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)を加え、これを5~10℃で約30分攪拌する。次に10mgのペプチド(H-Ala-Ala-Ala-Ala-OH)を加え、混合物を5~10℃で24時間維持する。副産物と未反応出発物質を除去するために、これを水に対して透析する。

## 【 0 0 5 6 】

## 実施例13

実施例12に記載の10mlの溶液に、20mgの水溶性カルボジイミド(N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)を加え、これを5~10℃で30分維持し、50 $\mu$ lのリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した10 $\mu$ gのアミノ官能化オリゴヌクレオチド(実施例7を参照)を加える。混合物を5~10℃で24時間維持し、次に水に対して透析して精製する。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/09004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SHI, KEYU ET AL: "Magnetic drug delivery system - adriamycin-carboxymethyl dextran magnetic nanoparticles" retrieved from STN Database accession no. 133:140083 XP002183998 abstract & SHENGWU YIXUE GONGCHENGXUE ZAZHI (2000), 17(1), 21-24 ,	1-25
E	WO 00 56288 A (ACROSS BARRIERS GES FUER NEUE ; INST NEUE MAT GEMEIN GMBH (DE); KNE) 28 September 2000 (2000-09-28) claims	1

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## Several categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*I\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 2001

Date of mailing of the international search report

13/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentbus 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040 Tx. 31 651 epo nl  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/09004

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
X	MYKHAYLYK, O. ET AL: "Glial brain tumor targeting of magnetite nanoparticles in rats" J. MAGN. MAGN. MATER. (2001), 225(1-2), 241-247 XP001041592 abstract	1-25



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/09004

Additional matter PCT/ISA/210

Continuation of Field 1.2

Relevant Patent Claims Nos. 1-25 relate to an excessively large number of possible compounds or products. In fact, they comprise so many alternatives that they appear, in the given context, unclear (and/or too lengthy) under the terms of PCT Article 6 as if they enabled a meaningful search. For this reason, the search was directed at the portions of the patent claims which can be regarded as clear (and/or concise), namely these compounds or products were searched, e.g. those cited in the examples, including closely-related homologous compounds that are cited in the description.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/09004

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0056288	-A	28-09-2000	DE	19912502 A1	21-09-2000
			WO	0056288 A1	28-09-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード (参考)
// C 0 7 K 17/14		C 0 7 K 17/14	
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ , CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG , ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM , DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS , LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM , TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72)発明者 ブスク, ノルベルト ドイツ連邦共和国 12437 ベルリン, エ ッシェンバッハシュトラッセ 4			
(72)発明者 クレメント, ヨアキム ドイツ連邦共和国 07749 イェナ, ビベ ルウエグ 24			
(72)発明者 ゲルナート, ペーター ドイツ連邦共和国 07747 イェナ, ユー ディスーアウエルーシュトラッセ 11			
(72)発明者 ヘフケン, クラウス ドイツ連邦共和国 99425 ウエイマー, アム ホルン 39			
(72)発明者 クリッシェ, ケーオリバー ドイツ連邦共和国 07751 ツェルニッツ ドルフシュトラッセ 30			
(72)発明者 コーベル, トーマス ドイツ連邦共和国 10713 ベルリン, シ グマリンガー シュトラッセ 30			
(72)発明者 シュナーベルラウヒ, マチアス ドイツ連邦共和国 07745 イェナ, イ ブラヒムシュトラッセ 3			
(72)発明者 フォグト, セバスチャン ドイツ連邦共和国 07749 イェナ, ツィ ーゲンハイナー シュトラッセ 67			
(72)発明者 ワグナー, ケルスティン ドイツ連邦共和国 07745 イェナ, ワン デルスレブシュトラッセ 7			

(72)発明者 ガンサウ、クリスチャン  
ドイツ連邦共和国 16761 ニーデルーノ  
イエンドルフ、スパンダウエル ランドシ  
ュトラーセ 96

Fターム(参考) 2G045 BA13 BB03 CA25 CB01 CB03  
CB07 CB13 CB14 FA36  
4B029 AA07 BB01 BB15 CC01 FA04  
4C085 HH20 JJ02 KA28 KB07 KB08  
KB82 KB91 LL18  
4H045 AA10 BA63 EA20 EA50 FA50  
FA81